

Gélose au Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol (DRBC)

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose au Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol (DRBC) est recommandée pour le dénombrement des levures et des moisissures viables dans les produits destinés à l'alimentation humaine et animale susceptibles d'en contenir, dont l'activité en eau est supérieure à 0,95, conformément à la méthode préconisée dans la norme NF ISO 21527-1 (décembre 2008).

HISTORIQUE

Les premiers milieux sélectifs destinés au dénombrement des levures et des moisissures présentaient un pH acide afin de limiter la croissance des bactéries. En 1962, les travaux réalisés par Mossel sur la recherche des levures et des moisissures dans les aliments, démontrent la supériorité des milieux à pH neutre contenant un agent antibactérien sur ceux dont le système sélectif est basé sur un pH acide. En 1973, Jarvis décrit la gélose rose bengale chlortétracycline, dans laquelle la combinaison du pigment et de l'antibiotique diminue la croissance des bactéries et limite la sporulation des moisissures. Suite à ces travaux, en 1979, King et ses collaborateurs montrent que l'introduction du dichloran et la réduction de la concentration en rose bengale permettent la récupération d'un plus grand nombre d'espèces de moisissures. Les résultats obtenus par ces mêmes auteurs montrent aussi que la limitation de la sporulation des moisissures était meilleure à pH 5,6 sur ce milieu. Parallèlement, Koburger et Rodgers (1978) montrent l'efficacité de la combinaison du chloramphénicol et de la chlortétracycline pour l'inhibition de la flore bactérienne. Enfin, en 1992, sur la base de travaux comparatifs sur les méthodes de recherche et de dénombrement, Beuchat préconise que l'ensemencement en surface doit être privilégié par rapport à l'ensemencement en profondeur pour le dénombrement des levures et des moisissures.

PRINCIPES

- La peptone et le glucose assurent la croissance des levures et des moisissures.
- Le dichloran et le rose bengale ralentissent le développement des bactéries et préviennent l'envahissement des boîtes de Petri par les moisissures en limitant leur prolifération. Le rose bengale assimilé par les levures facilite leur dénombrement en colorant les colonies en rose.
- La présence de chloramphénicol, antibiotique thermostable, et de chlortétracycline permet de renforcer la sélectivité du milieu vis-à-vis de la plupart des bactéries contaminantes.
- Le zinc et le cuivre présents sous forme de sulfates améliorent la production de pigments par les moisissures.
- Le tergitol limite la prolifération des *Mucoraceae*.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

PREPARATION

- Mettre en suspension 30 g de milieu déshydraté (BK198) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir à raison de 100 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Si le conditionnement prêt-à-liquéfier est utilisé (BM149 ou BM142), faire fondre la gélose pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.

NOTE 1 :

Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement

MODE D'EMPLOI

Dénombrement par ensemencement en surface :

- Couler en boîtes de Petri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser ou de ses dilutions décimales à la surface des boîtes préparées ou pré-coulées (BM143)
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à (25 ± 1)°C pendant 2 à 5 jours, à l'obscurité.

NOTE 2 :

Ne pas retourner les boîtes pendant l'incubation et entre les lectures, afin d'éviter le réensemencement des spores de moisissures pendant les manipulations.

Dénombrement par ensemencement par inclusion :

- Transférer 1 mL du produit à analyser et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler 10 à 15 mL de milieu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à (25 ± 1)°C pendant 2 et 5 jours, à l'obscurité.

NOTE 3 :

Dans le cas des dénombrements réalisés par inclusion, l'équivalence des résultats doit être validée par rapport à l'ensemencement en surface.

NOTE 4 :

Eviter l'exposition du milieu à la lumière, car les produits de décomposition cytotoxiques peuvent causer la sous-évaluation de la mycoflore dans les échantillons.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

LECTURE

Lire les boîtes entre deux jours et cinq jours d'incubation. Sélectionner les boîtes contenant moins de 150 germes et compter ces germes. Si l'on observe un envahissement rapide des boîtes, retenir les comptages obtenus après deux jours, puis de nouveau après cinq jours d'incubation. Si nécessaire, dénombrer séparément les levures et les moisissures. Les colonies de levures apparaissent en rose en raison de l'assimilation du rose bengale.
Les colonies de levures et de bactéries (non inhibées) pouvant être confondues, il peut être nécessaire de réaliser un test de confirmation à la loupe binoculaire ou au microscope.

FORMULE - TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone ....5,0 g
- Glucose ....10,0 g
- Phosphate monopotassique ....1,0 g
- $MgSO_4,H_2O$ ....0,5 g
- Dichloran ....2,0 mg
- Rose bengale ....25,0 mg
- Chloramphénicol ....50,0 mg
- Chlorhydrate de chlortétracycline...50,0 mg
- $ZnSO_4,7H_2O$ ....10,0 mg
- $CuSO_4,5H_2O$ ....5,0 mg
- Tergitol ....1 mL
- Agar agar bactériologique ....12,4 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,6 ± 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu déshydraté : poudre crème à rosâtre, fluide et homogène.
- Milieu préparé : gélose rose.

- Réponse culturale typique après 5 jours d'incubation à 25°C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
Saccharomyces cerevisiae	ATCC® 9763	$P_R \geq 50\%$
Candida albicans	ATCC 10231	$P_R \geq 50\%$
Aspergillus brasiliensis	DSM 1988	$P_R \geq 50\%$
Escherichia coli	ATCC 25922	inhibée, score 0
Bacillus subtilis	ATCC 6633	inhibée, score 0

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-8°C.
- La date de péremption est mentionnée sur l’étiquette.
- Milieu préparé en flacons : 3 mois à 2-8°C, à l’abri de la lumière (à titre indicatif).
- Milieu préparé en boîtes : 7 jours à 2-8°C, à l’abri de la lumière (à titre indicatif).

Milieu prêt-à-liquéfier :
- Stocker entre 2 et 8°C, à l’abri de la lumière
- La date de péremption est mentionnée sur l’étiquette

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri
- Stocker entre 2 et 8°C, à l’abri de la lumière
- La date de péremption est mentionnée sur l’étiquette

PRESENTATION	Code
Milieu déshydraté :	
- Flacon de 500 g	BK198HA
Milieux prêts-à-liquéfier :	
- Pack de 10 flacons de 100mL	BM14908
- Pack de 10 flacons de 200 mL	BM14208
Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (∅ 90 mm) :	
- Coffret de 20 boîtes	BM14308

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MOSSEL D.A.A., VISSER M. & MENGERINK W.J.H., 1962, A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages, Laboratory Practrice, **11** : 109-112.

JARVIS B., 1973, Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food, Journal of Applied Bacteriology, **36** : 723-727.

KORBURGER J.A. & RODGERS M.F., 1978, Single or multiple antibiotic-amended media to enumerate yeasts and moulds, Journal of Food Protection, **41** : 367-369.

KING A.D., HOCKING A.D. & PITT J.I, 1979, Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods, Applied and Environmental Microbiology, **37** : 959-964.

BEUCHAT L.R., 1992, Media for detecting and enumerating yeasts and moulds, International Journal of Food Microbiology, **17** : 145-158.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2), Janvier 2004, Microbiologie des aliments - Guide pour la préparation et la production des milieux de culture - Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

NF ISO 21527-1 (V 08-040-1), Novembre 2008 (2nd tirage), Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures – Partie 1 : Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95.

Les mentions portées sur l'étiquette sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2010-01-12.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BK198/F/2009-01 : 2.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr